

**平成 24～26 年度厚生労働科学研究費補助金**  
(肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業))  
分担研究報告書

**「肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞の治療効果機序の解明」**

研究分担者氏名： 酒井 佳夫  
所属機関： 金沢大学 職名： 准教授

**研究要旨：**

【目的】間葉系幹細胞は、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能に加え、肝細胞への分化能も報告されている。また、強力な抗炎症効果を有する。脂肪組織には間葉系幹細胞が豊富に含まれ、脂肪組織由来間質細胞 (ADSC) を用いた肝疾患に対する再生療法への応用開発が期待されるが、その治療効果機序には不明な点が多い。本研究では Concanavalin A (ConA) 誘導肝炎モデルマウスを用いて、ADSC による炎症についての治療効果機序を検討した。

【方法】C57BL/6 マウスに対し Concanavalin A を経尾静脈的に投与し、ConA 誘導肝炎モデルマウスを作成した。脂肪組織由来間質細胞を C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織より分離、培養継代し獲得した。ConA 誘導肝炎モデルマウスに対して、ADSC を経尾静脈的に投与し、血液生化学所見、および肝組織における免疫染色、遺伝子発現解析による検討を行った。

【成績】ConA 誘導肝炎モデルマウスにおいて投与後 6～24 時間後の血清 ALT 活性値および LDH 活性値上昇を確認した。一方、ADSC 投与により血清 ALT 活性値および LDH 活性値は有意な改善を認め、ADSC による治療効果を確認した。ConA 誘導肝炎モデルマウス肝組織内において CD4<sup>+</sup>、CD11b<sup>+</sup>、Gr-1<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup> 炎症細胞の浸潤が確認されたが、肝組織内 CD11b<sup>+</sup>、Gr-1<sup>+</sup>、F4/80<sup>+</sup> 細胞集簇は、ADSC 投与により著明に抑制された。また、ADSC を投与した ConA 肝炎マウスの肝組織の遺伝子発現解析により、ADSC による肝炎抑制効果は、ミエロイド系炎症細胞の抑制によることが示唆された。

【考案】ADSC 投与による ConA 肝炎の治療効果は、ミエロイド系細胞の抑制によることが示され、ADSC 投与による肝再生修復効果、機序に関する知見が得られた。

**A. 研究目的**

脳死肝移植の件数が伸び悩むなか、細胞移植による再生医療は大きく注目されている。特に間葉系幹細胞は多分化能および抗炎症作用の報告があり、また自己由来の細胞を用い、遺伝子操作を行わないことから再生療法への応用・開発が強く期待されている。一方で治療効果機序には不明な点が多い。本研究では Concanavalin A (ConA) 誘導肝炎モデルマウスを用い、ADSC による治療の効果と機序の詳細を検討した。

**B. 研究方法**

C57BL/6 マウスに対し Concanavalin A を経尾静脈的に投与し、ConA 誘導肝炎モデルマウスを作成した。脂肪組織由来間質細胞を

C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織より分離、培養継代し獲得した。ConA 誘導肝炎モデルマウスに対して、ConA 投与 3 時間後に ADSC を経尾静脈的に投与した。ConA 投与 24 時間後に血液を採取し、血清 ALT 活性値および LDH 活性値を確認した。肝組織を採取し CD4、CD11b、Gr-1、F4/80 抗体を用いた免疫染色を行い検討した。また、肝組織より RNA を抽出し DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析による検討を行った。

**C. 研究結果**

ConA 誘導肝炎モデルマウスにおいて投与後 6～24 時間後の血清 ALT 活性値および LDH 活性値上昇を確認した。血清 ALT 活性値および LDH 活性値は ConA 投与 3 時間後

に ADSC 投与を投与したところ、ConA 投与 24 時間後において有意に低下しており、ADSC による治療的効果を確認した。ConA 誘導肝炎モデルマウス肝組織に対する免疫組織化学染色をおこない CD4+, CD11b+, Gr-1+, F4/80+ 炎症細胞の浸潤が確認した。ConA 肝炎における肝組織内において CD11b+, Gr-1+, F4/80+細胞集簇は、ADSC 投与により著明に抑制された。また肝組織より RNA を抽出し DNA マイクロアレイにより遺伝子発現解析を行った。ADSC 投与により発現変化が生じた 309 遺伝子に関する階層クラスタリングで、細胞投与群とコントロール群に判別され、NCBI より公開されている造血系細胞の遺伝子発現データ (GSE27787)と比較したところ、Gr-1 陽性細胞、Mac1 陽性細胞と主に関連することが示され、これらの細胞が治療標的であることが示唆された。

#### D. 考察

ADSC 投与による肝炎の予防および治療効果機序として、ミエロイド炎症細胞の抑制が重要であることが示された。

#### E. 結論

脂肪組織由来間質細胞投与による肝再生修復効果、機序に関する知見が得られた。

### 研究発表

#### 1. 論文発表

1. 酒井佳夫、山下太郎、金子周一 肝癌幹細胞の生物学的特徴と幹細胞標的新規治療法開発の可能性 肝胆膵65巻1号63 - 71頁、2012年7月
2. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T,

Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. Eur J Immunol. 2013 Nov;43(11):2956-68.

3. Seki A, Sakai Y, Komura T, Nasti A, Yoshida K, Higashimoto M, Honda M, Usui S, Takamura M, Takamura T, Ochiya T, Furuichi K, Wada T, Kaneko S. Adipose tissue-derived stem cells as a regenerative therapy for a mouse steatohepatitis-induced cirrhosis model. Hepatology. 2013 Sep;58(3):1133-42.

4. Komura T, Taniguchi T, Sakai Y, Yamashita T, Mizukoshi E, Noda T, Okajima M, Kaneko S. The efficacy of Continuous Plasma Diafiltration Therapy in critical Patients with Acute Liver Failure. J Gastroenterol Hepatol Apr;29(4):782-6, 2014

#### 2. 学会発表

1. 酒井佳夫、関 晃裕、金子周一. 肝硬変に対する脂肪組織由来間質細胞による肝再生療法開発. JDDW. 神戸. 2012
2. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Takuya Komura, Mami Higashimoto, Haruo Fujinaga, Masao Honda, Takashi Wada, Toshinari Takamura, Takahiro Ochiya, Shuichi Kaneko. Therapeutic effect of adipose derived mesenchymal stem cell to murine NASH liver cirrhosis inactivating Kupffer/Macrophage and helper T cell. AASLD, Boston, 2012.
3. Akihiro Seki, Yoshio Sakai, Mami Higashimoto, Takuya Komura, Alessandro Nasti, Keiko Yoshida, Takahiro Ochiya, Takashi Wada, Masao Honda, Shuichi Kaneko.

Features of immunomodulatory and therapeutic effects of mesenchymal stromal/stem cells on non-alcoholic steatohepatitis murine model in early and cirrhotic phases. The 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. Washington DC, Nov.1-5, 2013

4. 酒井佳夫、関晃裕、金子周一。脂肪組織由来間質細胞を用いた肝硬変に対する肝再生療法実用化への基礎的検討。シンポジウム消S10-1、第55回日本消化器病学会大会、グランドプリンスホテル新高輪、東京、平成25年10月10日

5. 酒井佳夫、関晃裕、金子周一。肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来間質細胞投与による肝修復再生効果の検討。パネルディスカッション PD1-08、第40回日本肝臓学会西部会、岐阜都ホテル、岐阜、平成25年12月6日

6. 関晃裕、酒井佳夫、Alessandro Nasti、吉田佳子、東元真実、小村卓也、本多政夫、金子周一。肝硬変マウスモデルにおける脂肪組織由来幹細胞による肝修復再生療法の検討。ポスターセッションP-156、第49回日本肝臓学会総会、京王プラザホテル、東京、平成25年6月6日

7. 酒井佳夫、関晃裕、東元真実、吉田佳子、ナスティ・アレッサンドロ、小村卓也、本多政夫、金子周一。前臨床非アルコール性肝炎肝硬変マウスモデルに対する脂肪組織由来間質細胞投与による肝修復再生治療効果の検討、ワークショップ WS2-6、第50回日本肝臓学会総会、平成26年5月29日 ホテルニューオータニ、東京

8. Kazunori Kawaguchi, Masao Honda, Taro Yamashita, Kouki Nio, Hikari Okada, Kuniaki

Arai, Yoshio Sakai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, Shuichi Kaneko. Notch signal-activated hepatoma cells are associated with Jagged1 genomic abnormality, and Notch inhibitors efficiently suppress EpCAM+ liver cancer stem cells. 第65回 AASLD 60 巻 S4 号 131A 2014.11.9

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし